

王 琦,谢晓佩,吴庆侠,等. 牦牛源枯草芽孢杆菌的益生作用研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(11):157-165.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.11.032

牦牛源枯草芽孢杆菌的益生作用研究

王 琦¹, 谢晓佩¹, 吴庆侠¹, 董海龙¹, 李家奎¹, 曾江勇², 马宏财²

(1. 西藏农牧学院动物科学学院, 西藏林芝 860000; 2. 西藏自治区农业科学院畜牧兽医研究所, 西藏拉萨 850000)

摘要: 益生枯草芽孢杆菌可以替代部分抗生素, 安全无污染, 在临床上具备治疗、预防细菌性肠道疾病的功效。为研究牦牛源枯草芽孢杆菌对大肠埃希氏菌是否具有益生作用, 试验采用体外抑菌试验、药敏试验、大肠埃希氏菌攻毒和制作石蜡切片观察肠道组织变化的方法, 探究其益生作用。结果表明, 在 4 株牦牛源枯草芽孢杆菌中, Yak-KC7 的抑菌效果最佳, 抑菌直径达到 (25 ± 1) mm; 其次是 Yak-KC1、Yak-KC5、Yak-KC6, 抑菌直径分别达到 (17 ± 1) 、 (22 ± 2) 、 (20 ± 2) mm。从病理切片得出, 试验组肠道组织较对照组大幅改善。因此, 该菌具有治疗大肠埃希氏菌疾病的作用, 有作为益生菌株的潜能, 为西藏地区益生菌种提供了参考。

关键词: 牦牛源枯草芽孢杆菌; 益生作用; 大肠埃希氏菌; 治疗; 切片

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)11-0157-09

在集约化、规模化的动物生产模式下, 畜禽舍诸多应激因子富集, 致使动物机体免疫力下降, 发病率大幅提高。我国从 20 世纪 80 年代开始使用抗生素, 以此来预防、治疗细菌感染, 促进动物生

长^[1]。长期以来, 应用抗生素治疗细菌性疾病的方法虽对畜禽疾病有显著成果, 但随着抗生素的普及甚至滥用, 却给社会带来了药物残留、病菌产生耐药性、环境污染等多种问题, 直接危害人类健康^[2]。严格控制抗生素的使用, 杜绝其滥用已成为各国的共识。因此, 寻求无污染、无毒副作用、无药物残留、效果好的微生态制剂已成为研究的热点^[3-4]。抗生素的替代品有多种, 而在众多替代品中, 益生菌作为一种无毒、无害、无药物残留、无耐药性的微生态制剂, 有利于平衡肠道内的菌群, 可治疗、预防细菌性疾病, 已成为动物疾病防治的新选择^[5]。

长期以来, 腹泻一直是困扰动物行业的一个重

收稿日期: 2019-07-02

基金项目: 西藏自治区重点研发及转化计划(编号: XZ201902NB05); 西藏自治区科技重大专项(编号: XZ201901NA02); 国家肉牛牦牛产业技术体系(编号: CARS-37)。

作者简介: 王 琦(1997—), 女, 山东泰安人, 从事动物医学研究。

E-mail: 1154101489@qq.com。

通信作者: 吴庆侠, 博士, 副教授, 研究方向为动物疾病病理研究。

E-mail: goodwqx@163.com。

出了坚实的一步。

参考文献:

- [1] 蒋志刚, 丁玉华. 大丰麋鹿与生物多样性[M]. 北京: 中国林业出版社, 2011: 1-12.
- [2] 任义军, 丁玉华, 解生彬, 等. 野生麋鹿发情后期行为比较[J]. 野生动物, 2011, 32(6): 309-311, 342.
- [3] 任义军, 沈 华, 俞晓鹏, 等. 哺乳期仔麋鹿体重体尺动态变化及相关性研究[J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(7): 6-9.
- [4] Yuan B, Wang L, Xie S, et al. Density dependence effects on demographic parameters - a case study of Père David's deer (*Elaphurus davidianus*) in captive and wild habitats [C]//Biology and environment; Proceedings of the Royal Irish Academy. Royal Irish Academy, 2017, 117(3): 139-144.
- [5] 丁玉华. 中国麋鹿研究[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2004: 65-80.

- [6] 陆 军, 梁崇歧, 于长青. 麋鹿幼仔一周龄内的活动观察[J]. 兽类学报, 1993, 13(4): 251-255.
- [7] 李 坤, 陈 颀, 唐宝田. 麋鹿幼仔人工哺育及驯化[J]. 经济动物学报, 2008, 12(4): 197-199.
- [8] 盛和林, 徐宏发. 哺乳动物野外研究方法[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992: 298-300.
- [9] 李和平, 王春生. 生态养鹿[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 232-251.
- [10] 马丽娟, 金顺丹, 韦旭斌, 等. 鹿生产与疾病学[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1998: 248-365.
- [11] 钟震宇, 张林源, 夏经世, 等. 雌性麋鹿不同年龄阶段的生长发育[J]. 四川动物, 2008(5): 907-909.
- [12] 杜 锐, 魏吉祥. 中国养鹿与疾病防治[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 180-190.
- [13] 徐安宏, 丁玉华, 沈 华. 麋鹿幼仔的人工哺育[J]. 野生动物, 1995, 88(6): 30-31.

要问题,大量甚至过量使用抗生素,虽然能在短期内奏效,但缺乏长期可持续效果^[6]。由于抗生素的普遍使用,致使外界环境和动物体内的细菌对现在所使用的抗生素都表现出不同程度的耐药性,因此寻求一种新的安全有效、无污染的抗生素替代物对动物行业的可持续发展至关重要^[6]。与此同时,西藏牦牛多发春季腹泻,现阶段开发的枯草芽孢杆菌制品并不能完全科学高效地适应西藏牧区的需要,因此筛选出安全、科学、有效的适宜高原动物使用的具有益生性能的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)至关重要。

1 试验材料

1.1 菌株

耐肠液耐胆盐的牦牛源枯草芽孢杆菌 4 株(Yak-KC1、Yak-KC5、Yak-KC6、Yak-KC7),均由西藏农牧学院兽医临床重点实验室分离保存。

大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁),由西藏农牧学院兽医临床重点实验室提供;金黄色葡萄球菌(ATCC29213),由南京合益生物技术有限公司供给。

1.2 试验动物

4 只健康家兔购自林芝某农贸市场。

1.3 主要试剂及试剂盒

药敏纸片、营养琼脂(NA)、枯草芽孢杆菌选择培养基、伊红美蓝琼脂、营养肉汤(NB)、麦康凯琼脂均购自杭州滨和微生物试剂设备有限公司;95%乙醇、切片石蜡、二甲苯均购自成都市联合化工试剂研究所;苏木精染色液(A液)、伊红染液(醇溶型)(B液)、分化液(C液)、返蓝液(D液)、10%福尔马林中性固定液均购自南昌雨露实验设备有限公司。

1.4 主要仪器

LRH-150 生化培养箱、干热消毒箱均购自上海森信实验仪器有限公司;Jan-90 磁力搅拌器、电子天平、HH S-2 数显恒温水浴锅、HNY-2112B 恒温振荡器均购自金坛市盛蓝仪器制造有限公司;台式高速离心机购自长沙湘鹰离心机有限公司;TDZ4-WS 台式低速离心机购自湖南湘仪离心机仪器有限公司;立式压力蒸汽灭菌器购自上海博迅实业有限公司医疗设备厂;倒置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司;QP-3168 转轮式石蜡切片机、TEC-2800 病理组织包埋冷冻台、TEC-2800 组织包埋机均购自常州市郝思林医用仪器有限公司;超净工作台购自苏净安泰空气技术有限公司。

2 试验方法

2.1 菌液复苏

取于 -80 ℃ 冰箱保存的枯草芽孢杆菌 Yak-KC1、Yak-KC5、Yak-KC6、Yak-KC7 的菌液各 1 mL,将其接种于 *B. subtilis* 选择培养基上,在 37 ℃ 恒温培养箱培养 24 h,将菌复苏,然后用接种环选取单个菌落,接种于 100 mL NB 培养基中,在 37 ℃ 恒温摇床中培养 12 h,以增强细菌活力^[7]。

2.2 牦牛源枯草芽孢杆菌的抑菌试验

对复苏的 4 株牦牛源枯草芽孢杆菌的 12 h 培养物 3 500 r/min 离心 5 min。将指示菌大肠埃希菌(血清型 O₁₁₁)、金黄色葡萄球菌(ATCC29213)复苏,指示菌菌液浓度稀释至 10 万 CFU/mL。分别取已稀释好的大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)菌液 0.4 mL 和金黄色葡萄球菌菌液 0.4 mL,用灭菌的三角环均匀涂布在麦康凯琼脂培养基、伊红美蓝琼脂培养基和 NA 培养基上,用镊子取出已被灭菌的牛津杯,轻轻放在已涂布过大肠杆菌 O₁₁₁ 菌液的麦康凯琼脂培养基、伊红美蓝琼脂培养基和涂布过金黄色葡萄球菌菌液的 NA 培养基上,每个培养基上放 4 只牛津杯,注意 4 只牛津杯的分布位置要均匀。然后将其放入 4 ℃ 冰箱中,30 min 后取出。分别吸取 0.25 mL 离心后的 Yak-KC1、Yak-KC5、Yak-KC6、Yak-KC7 的上清液,然后分别注入 4 个牛津杯中^[8],先将其放入 4 ℃ 冰箱扩散 24 h,然后接着将其放入 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h,观察有无抑菌圈产生,用游标卡尺精准测量抑菌圈直径^[9]。该试验操作 3 次,取平均值。

2.3 牦牛源枯草芽孢杆菌的药敏试验

采用 K-B 纸片扩散法,根据抑菌圈直径判断分离的菌株对于常见的抗菌药物是否敏感^[10]。

复苏菌液:用接种环挑取单个菌落接种于 NB 培养基中,于 37 ℃ 恒温摇床中培养 12 h,进行增菌。取 0.4 mL 已稀释好的枯草芽孢杆菌菌液,用灭菌的三角环均匀涂布在枯草芽孢杆菌选择培养基上,待菌液干后,用灭菌镊子取药敏纸片均匀贴于培养基表面。37 ℃ 恒温培养 24 h。24 h 后将其拿出,用游标卡尺精准测量抑菌圈直径^[11]。该试验操作 3 次,取平均值。

2.4 牦牛源枯草芽孢杆菌对被大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)攻毒的家兔的治疗作用研究

2.4.1 动物试验设计 在林芝农贸市场购买 4 只

状态良好的家兔,经临床检查 4 只家兔均健康。将家兔随机分为 2 组。4 只健康家兔分别编号为 1#、2#、3#、4#。1#、2#为对照组,3#、4#为试验组。试验过程中,2 组兔单独饲养,饲养环境保持通风,饲料、饮水保证充足,卫生状况条件良好。饲喂周期为 14 d。

试验进行到 15 d 时,将大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)经 37 ℃ 恒温摇床培养 12 h 后离心,收集菌体,将菌液调整到攻毒浓度^[12],对 4 只家兔采用腹腔注射的方法注射大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)。每日注射浓度为 10 亿 CFU/mL 的大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁),5 mL/只,1 次/d,连续注射 4 d。4 只家兔均腹泻,腹泻率为 100%。对照组 2 只家兔不作处理,使其自然止泻,其中 1 只死亡,死亡率为 50%。给试验组 2 只家兔灌服牦牛源枯草芽孢杆菌菌液,灌服剂量均为 20 mL/只,1 次/d,连续给药 7 d,每日观察家兔腹泻情况以及对照组和试验组家兔止泻情况,并记录^[13]。

2.4.2 肠道病理组织观察 连续给药 7 d 后给兔耳静脉注射空气,将 3 只(共 4 只家兔,其中 1 只死于腹泻)家兔处死,取材,制作石蜡切片。取材时打开腹腔,将整个消化管取出,观察是否有出血斑、出血点等病变现象,找到健康组织与病变组织的交界处,10 min 内分段取材,分别取十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠各 1 cm³,然后用 10% 中性福尔马林固定液固定。制作石蜡切片时将病变组织切成 5 mm 大小,制作成石蜡切片(厚度为 6 μm),最后用苏木素-伊红染色,用光学显微镜观察组织病理变化情况。石蜡切片制作过程参照《家畜组织学与胚胎学实验指导》完成,并做部分修改^[14]。

3 结果与分析

对 4 株枯草芽孢杆菌进行了大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)、金黄色葡萄球菌的抑菌试验。4 个菌株对大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)和金黄色葡萄球菌都具有抑菌作用,但抑菌效果不同。其中,Yak-KC1、Yak-KC5、Yak-KC6 对致病菌的抑制能力较强,Yak-KC7 对致病菌的抑制能力最佳。

3.1 抑菌试验结果

4 株牦牛源枯草芽孢杆菌对大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)和金黄色葡萄球菌都具有抑菌作用,但抑菌效果不同^[15]。对金黄色葡萄球菌,Yak-KC7 的抑菌效果最佳,抑菌直径最大,达到 26 mm;其次是

Yak-KC1、Yak-KC5、Yak-KC6,抑菌直径分别达到(16±1)、(20±2)、(20±1) mm。对大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁),Yak-KC7 的抑菌效果最佳,抑菌直径达到(25±1) mm;其次是 Yak-KC1、Yak-KC5、Yak-KC6,抑菌直径分别达到(17±1)、(22±2)、(20±2) mm。抑菌圈直径详见表 1 和图 1 至图 9。

表 1 牦牛源枯草芽孢杆菌对大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)和金黄色葡萄球菌的抑菌结果

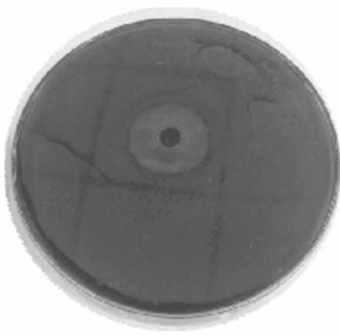
| 抑制金黄色葡萄球菌 | 抑菌圈直径(mm) | 抑制大肠埃希氏菌(血清型 O ₁₁₁) | 抑菌圈直径(mm) |
|-------------|-----------|---------------------------------|-----------|
| Yak-KC1(NA) | 17 | Yak-KC1(伊红美蓝) | 17 |
| Yak-KC1(NA) | 16 | Yak-KC1(伊红美蓝) | 16 |
| Yak-KC5(NA) | 20 | Yak-KC5(伊红美蓝) | 21 |
| Yak-KC5(NA) | 22 | Yak-KC5(伊红美蓝) | 22 |
| Yak-KC6(NA) | 19 | Yak-KC6(伊红美蓝) | 19 |
| Yak-KC6(NA) | 20 | Yak-KC6(伊红美蓝) | 22 |
| Yak-KC7(NA) | 25 | Yak-KC7(伊红美蓝) | 25 |
| Yak-KC7(NA) | 26 | Yak-KC7(伊红美蓝) | 26 |
| | | Yak-KC1(麦康凯) | 18 |
| | | Yak-KC1(麦康凯) | 16 |
| | | Yak-KC5(麦康凯) | 23 |
| | | Yak-KC5(麦康凯) | 24 |
| | | Yak-KC6(麦康凯) | 20 |
| | | Yak-KC6(麦康凯) | 18 |
| | | Yak-KC7(麦康凯) | 26 |
| | | Yak-KC7(麦康凯) | 24 |

3.2 药敏试验结果

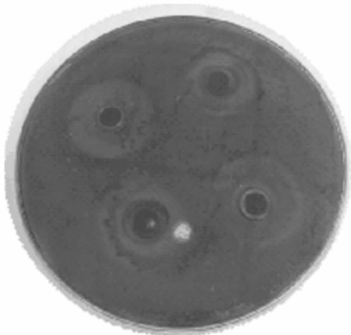
采用 K-B 纸片扩散法,选取 20 种常用药物做试验,Yak-KC1、Yak-KC5、Yak-KC6、Yak-KC7 对于链霉素具有中度敏感性,说明 4 个菌株对链霉素有一定的耐受性;而对于绝大多数的药物敏感,不具有耐受性。试验结果表明,Yak-KC1、Yak-KC5、Yak-KC6、Yak-KC7 均无耐药性,无携带耐药基因的风险。在使用益生枯草芽孢杆菌时,不应与其敏感的抗生素一起使用,这是保证益生菌发挥作用的关键^[16],这样既可提高动物的抵抗力,又可增强微生态制剂的应用效果。药物敏感试验结果详见表 2。药敏试验抑菌圈直径见图 10 至图 12。

3.3 牦牛源枯草芽孢杆菌对被大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)攻毒的家兔的治疗作用

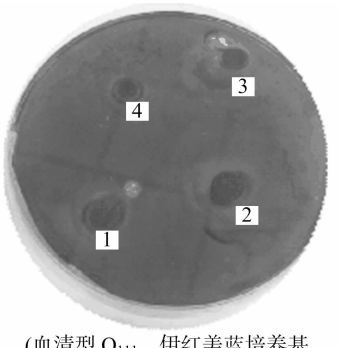
用筛选出的益生性能最佳的枯草芽孢杆菌 Yak-KC7,探究其对被大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)攻毒的家兔的治疗作用。



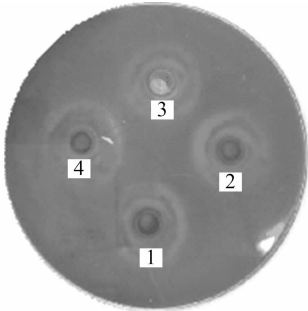
(血清型 O₁₁₁, 伊红美蓝培养基)
图1 Yak-KC5 抑制大肠埃希氏菌



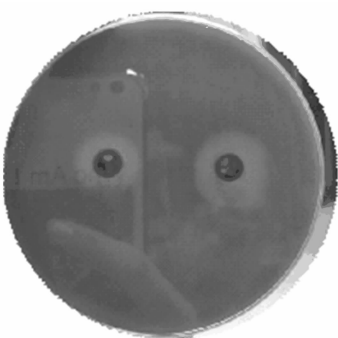
(血清型 O₁₁₁, 伊红美蓝培养基)
图2 Yak-KC7 抑制大肠埃希氏菌



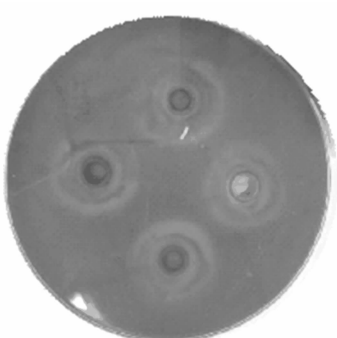
(血清型 O₁₁₁, 伊红美蓝培养基,
1、2 为 Yak-KC6, 3、4 为 Yak-KC1)
图3 Yak-KC6 和 Yak-KC1 抑制大肠埃希氏菌



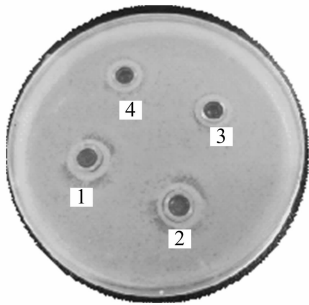
(血清型 O₁₁₁, 麦康凯培养基,
1、2 为 Yak-KC5, 3、4 为 Yak-KC6)
图4 Yak-KC5 和 Yak-KC6 抑制大肠埃希氏菌



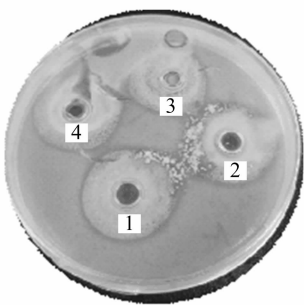
(血清型 O₁₁₁, 麦康凯培养基)
图5 Yak-KC1 抑制大肠埃希氏菌



(血清型 O₁₁₁, 麦康凯培养基)
图6 Yak-KC7 抑制大肠埃希氏菌



1、2 为 Yak-KC6, 3、4 为 Yak-KC1
图7 Yak-KC6 和 Yak-KC1 抑制金黄色葡萄球菌(NA)



1、2 为 Yak-KC7, 3、4 为 Yak-KC5
图8 Yak-KC7 和 Yak-KC5 抑制金黄色葡萄球菌(NA)



1 为 Yak-KC5, 3 为 Yak-KC6,
2、4 为 Yak-KC1
图9 Yak-KC5、Yak-KC6 和 Yak-KC1 抑制金黄色葡萄球菌(NA)

攻毒对照组 2 只家兔腹泻率为 100%, 自然止泻, 不作任何处理, 死亡率为 50%, 死亡前, 精神状态不佳, 喜卧, 被毛粗乱无光泽; 死亡后, 粪便有特殊气味, 恶臭, 呈稀糊状, 颜色为黄绿色。家兔肛门尾部及其周围附有黏粪, 详见图 13。试验组腹泻率 100%, 死亡率 0%。给药 7 d 后, 观察腹泻情况, 试验组家兔经 Yak - KC7 的治疗, 剂量 20 mL/头, 1 次/d, 共给药 7 d, 无死亡, 详见图 14。制作石蜡切片观察肠道组织变化, 结果表明牦牛源枯草芽孢杆菌对被大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)攻毒的家兔具有明显的治疗作用, 详见图 15 至图 38。

由病理组织切片可观察到, 对照组十二指肠肠壁绒毛逐渐开始溶解, 绒毛变短且排列稀疏; 试验组十二指肠绒毛排列紧密并增长, 似圆指状。对照组空肠绒毛与肠壁分离, 绒毛上段断裂, 细胞排列混乱; 试验组空肠绒毛断裂减轻, 肠壁与肠绒毛未分离, 细胞间连接正常。对照组回肠肠壁绒毛与肠壁分离, 绒毛中段破碎严重, 细胞间的连接结构发生变形; 试验组回肠绒毛破碎减轻, 未出现绒毛与肠壁分离现象。对照组盲肠部分肠壁绒毛断裂; 试验组盲肠破坏程度大大减轻。对照组结肠绒毛严重破碎, 细胞排列混乱、混淆不清, 绒毛与肠壁开始

表 2 牦牛源枯草芽孢杆菌对 20 种常用药物的敏感试验结果

| 抗生素 | 敏感度 | | | |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Yak - KC1 | Yak - KC5 | Yak - KC6 | Yak - KC7 |
| 氯霉素 | S | S | S | S |
| 四环素 | S | S | S | S |
| 克林霉素 | S | S | S | S |
| 万古霉素 | S | S | S | S |
| 诺氟沙星 | S | S | S | S |
| 氧氟沙星 | S | S | S | S |
| 恩诺沙星 | S | S | S | S |
| 青霉素 | S | S | S | S |
| 庆大霉素 | S | S | S | S |
| 头孢唑林 | S | S | S | S |
| 丁胺卡那 | S | S | S | S |
| 复方新诺明 | S | S | S | S |
| 氨苄西林 | S | S | S | S |
| 阿莫西林 | S | S | S | S |
| 头孢拉定 | S | S | S | S |
| 头孢呋辛 | S | S | S | S |
| 头孢氨苄 | S | S | S | S |
| 红霉素 | S | S | S | S |
| 链霉素 | I | I | I | I |
| 呋喃唑酮 | S | S | S | S |

注:S 表示敏感,I 表示中度敏感,R 表示耐药。

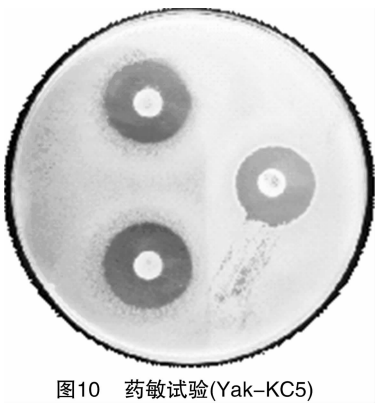


图10 药敏试验(Yak-KC5)

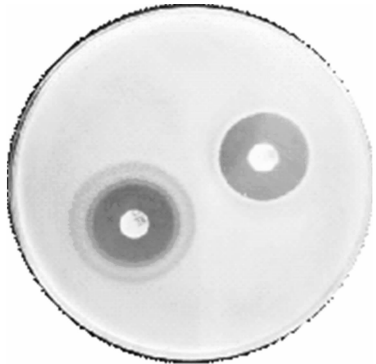


图11 药敏试验(Yak-KC6)



图12 药敏试验(Yak-KC7)



图13 对照组腹泻死亡家兔



图14 试验组经 Yak-KC7 治疗家兔

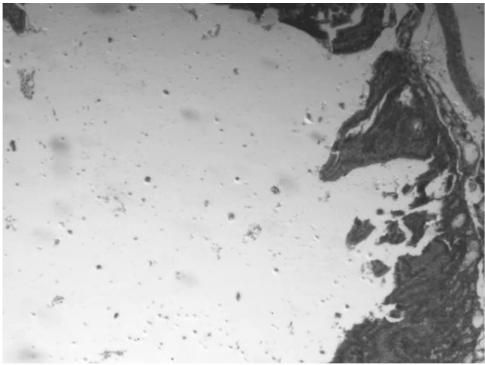


图15 对照组十二指肠 1(HE 染色, 100×)

分离;试验组结肠绒毛破碎减轻。对照组直肠与试验组直肠无显著性差异。

综上,试验组肠道病理变化较对照组肠道病理变化均大幅改善。对照组肠道损伤较大,刷状缘损伤,微绒毛萎缩,上皮细胞排列紊乱。具体表现为

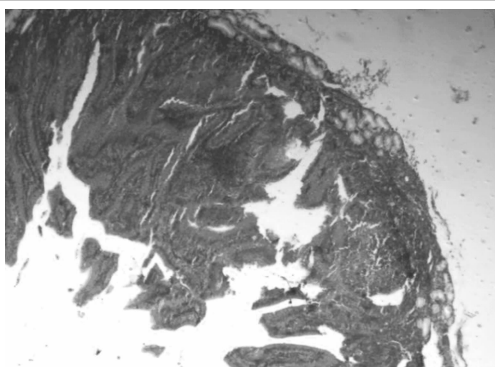


图16 对照组十二指肠 2(HE 染色, 100×)

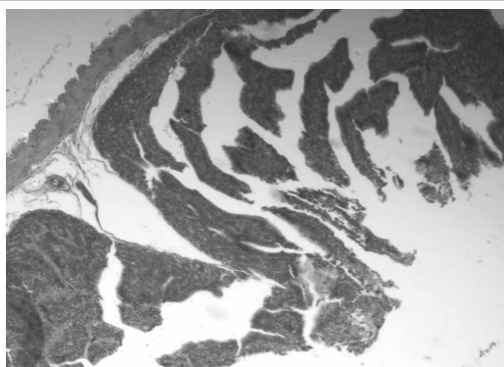


图20 对照组空肠 2(HE 染色, 100×)

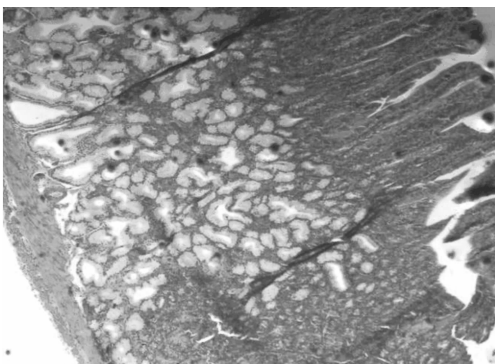


图17 试验组十二指肠 1(HE 染色, 100×)

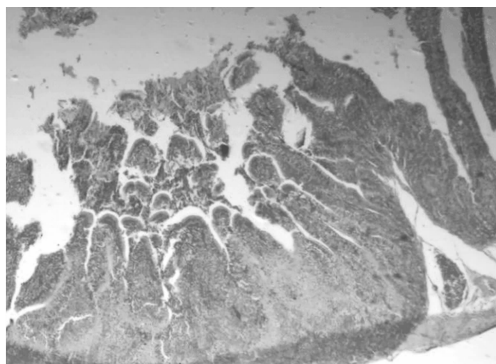


图21 试验组空肠 1(HE 染色, 100×)

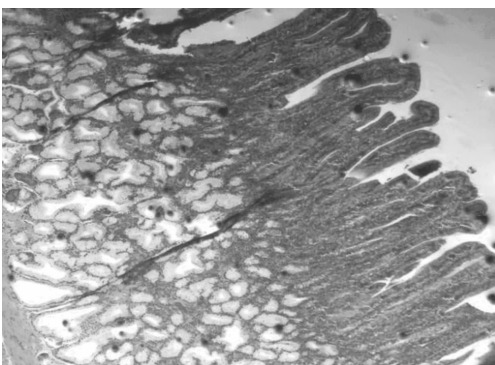


图18 试验组十二指肠 2(HE 染色, 100×)

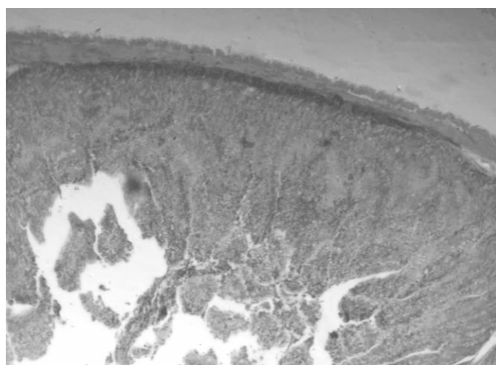


图22 试验组空肠 2(HE 染色, 100×)

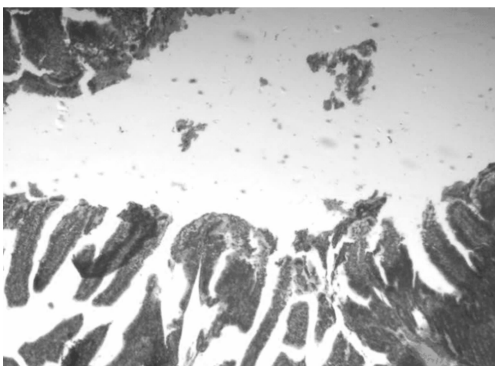


图19 对照组空肠 1(HE 染色, 100×)

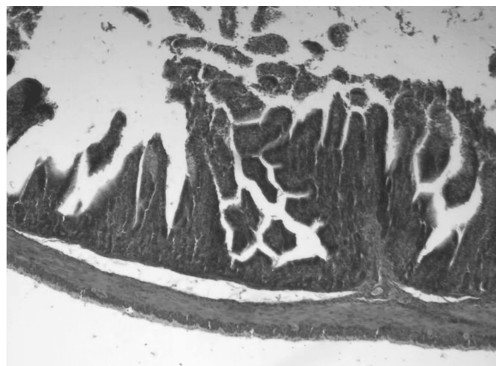


图23 对照组回肠 1(HE 染色, 100×)

肠黏膜水肿、萎缩、坏死,细胞排列混乱,肠壁脱落明显,细胞间的连接结构扭曲。结构变化导致功能受损,导致动物严重腹泻。试验组经牦牛源枯草芽

孢杆菌 Yak-KC7 治疗,绒毛水肿现象、黏膜病理变化显著改善,绒毛高度明显增加,排列更紧凑整齐,上皮细胞无脱落现象^[17-21]。

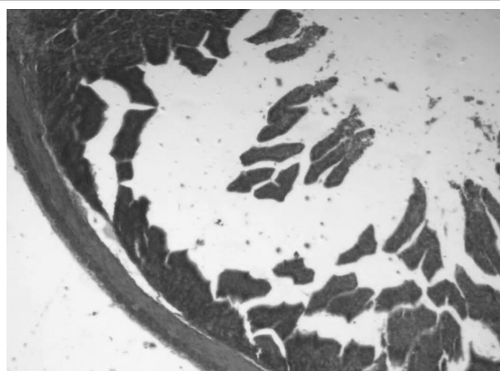


图24 对照组回肠 2(HE 染色, 100×)

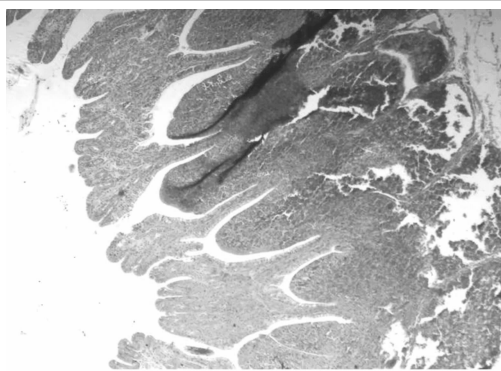


图28 对照组盲肠 2(HE 染色, 100×)

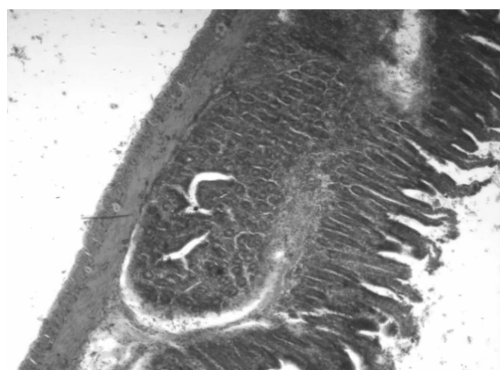


图25 试验组回肠 1(HE 染色, 100×)

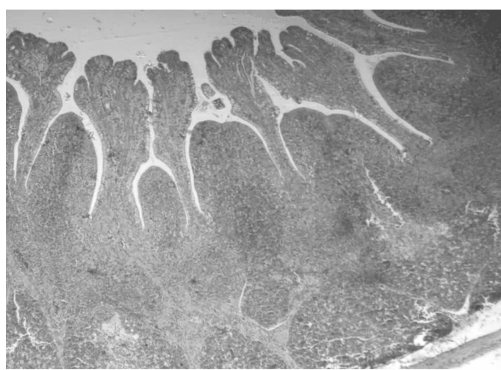


图29 试验组盲肠 1(HE 染色, 100×)

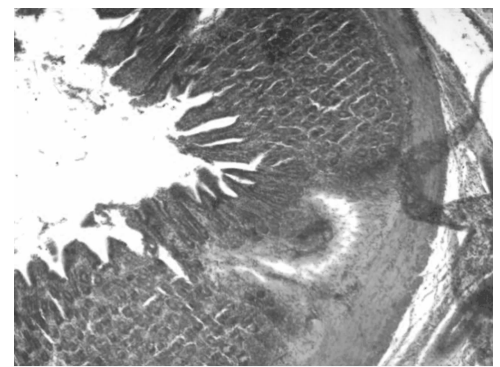


图26 试验组回肠 2(HE 染色, 100×)

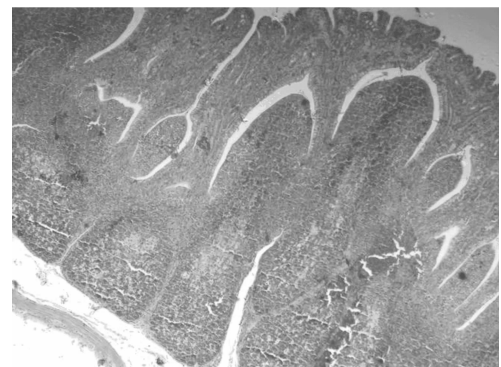


图30 试验组盲肠 2(HE 染色, 100×)

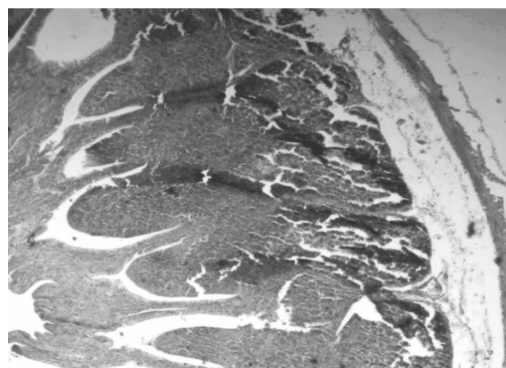


图27 对照组盲肠 1(HE 染色, 100×)

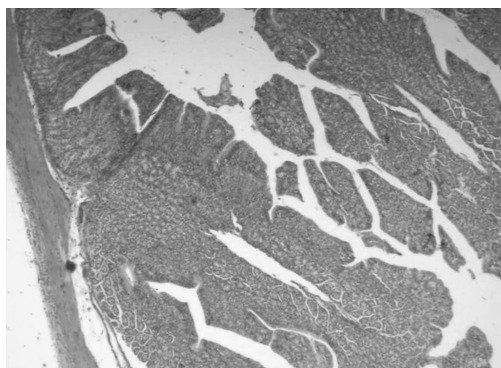


图31 对照组结肠 1(HE 染色, 100×)

4 讨论

益生枯草芽孢杆菌作为一种生物拮抗剂,有利

于平衡肠道菌群,还能够治疗、预防细菌性疾病^[22]。且由于能够产生芽孢,在长期储存甚至恶劣环境中仍可以保证活菌数,因此成为了益生菌的热选方向

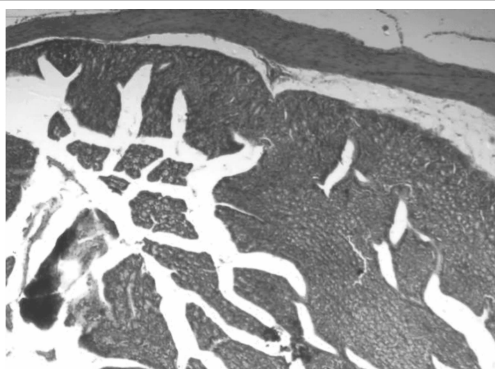


图32 对照组结肠 2(HE 染色, 100×)

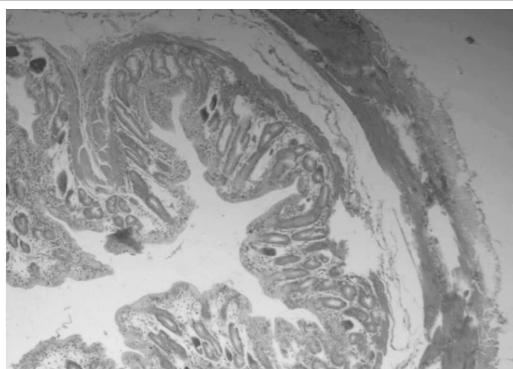


图36 对照组直肠 2(HE 染色, 100×)

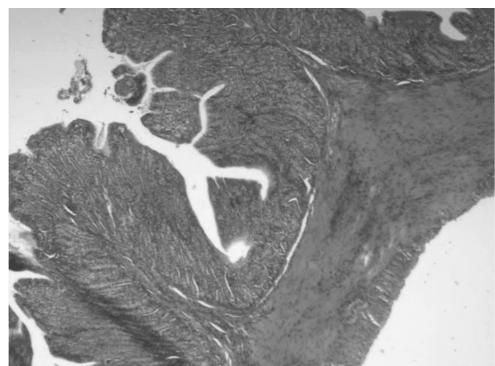


图33 试验组结肠 1(HE 染色, 100×)

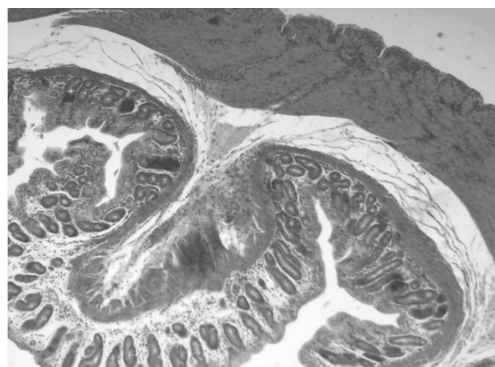


图37 试验组直肠 1(HE 染色, 100×)

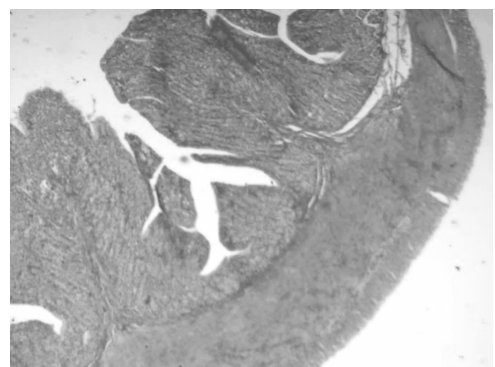


图34 试验组结肠 2(HE 染色, 100×)

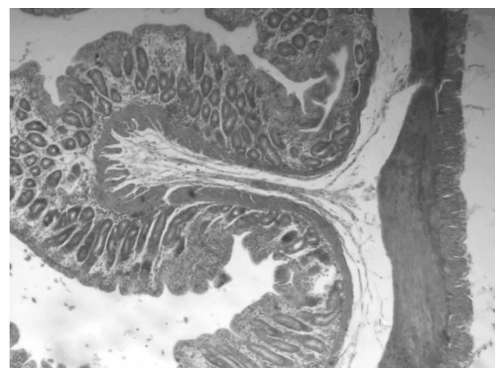


图38 试验组直肠 2(HE 染色, 100×)

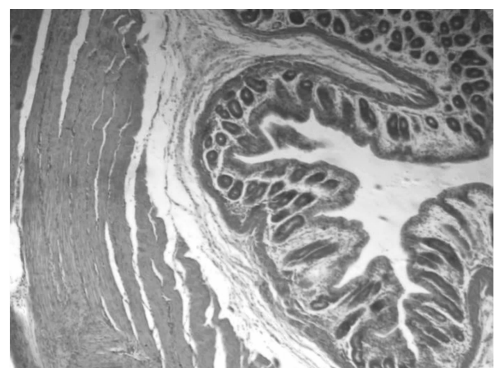


图35 对照组直肠 1(HE 染色, 100×)

郭梦娇在研究中指出, 尽管许多科研成果表明 *B. subtilis* 具有益生菌的潜力和功能, 但 *B. subtilis* 至今在市场上没有得到很好的应用。研究表明, 主要原因是没有性能足够优良的菌种用于实际生产^[21]。

4.1 抑菌试验

研究证明, 大多数芽孢杆菌对革兰氏阳性和革兰氏阴性有致病能力的菌都有抑制作用^[23], 对金黄色葡萄球菌、致病性大肠杆菌、沙门氏菌、产气荚膜梭菌等都有抑制能力。而本试验仅证明了 Yak - KC1、Yak - KC5、Yak - KC6、Yak - KC7 对大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)、金黄色葡萄球菌表现出较强的抑制能力, 因此后续还应对更多菌种进行抑菌试验。

4.2 药敏试验

至关重要, 益生菌须满足不具有耐药性这

之一^[23]。本试验便是通过给被大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)攻毒的家兔灌服牦牛源枯草芽孢杆菌 Yak - KC7, 探究其对家兔肠道组织是否具有益生作用。

一特性,以确保食用安全性。试验结果表明,牦牛源枯草芽孢杆菌不具有耐药性,不存在携带或转移耐药基因的风险。研究表明,在使用益生枯草芽孢杆菌时,不应与其敏感的抗生素一起使用,这是保证益生菌起作用的关键。

4.3 牦牛源枯草芽孢杆菌对被大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)攻毒的家兔的治疗作用

动物性试验的牦牛源枯草芽孢杆菌使用剂量是根据枯草芽孢杆菌对大肠杆菌 O₁₁₁ 攻毒的家兔治疗使用剂量的试验而定。治疗剂量为 20 mL/头,1 次/d,持续给药 7 d。关于牦牛源枯草芽孢杆菌对被大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)攻毒家兔细菌性腹泻的治疗作用,笔者仅进行了每天给药 1 次的治疗试验,而没有做每天给药 2 次和 3 次的试验,每天给药 2 次和 3 次的治疗率将大于每天给药 1 次的治疗率。综上,牦牛源枯草芽孢杆菌具有治疗被大肠埃希氏菌感染的细菌性肠道疾病的作用。试验期间未发现不良反应。

由组织石蜡切片可看出,大肠埃希氏菌对动物肠道造成了不同程度的破坏,回肠和结肠组织破坏程度最严重,十二指肠、空肠、盲肠次之,直肠变化不明显。该试验攻毒是采用腹腔注射的方法,若采用灌服的方法,组织变化是否会有所不同,还需进一步研究探讨。

试验组家兔肠道病理变化较对照组肠道病理变化均大幅改善。对照组肠道破坏程度较大,微绒毛萎缩,刷状缘损伤,上皮细胞排列混乱。具体表现为肠黏膜水肿、萎缩,严重的甚至坏死,细胞排列紊乱,肠壁脱落明显,细胞间的连接结构变形。试验组经牦牛源枯草芽孢杆菌 Yak-KC7 治疗,绒毛水肿现象、黏膜病理变化明显减轻,绒毛高度明显增加,排列更紧凑整齐,上皮细胞无脱落现象。

5 结论

本试验结果表明,4 株牦牛源枯草芽孢杆菌 Yak-KC1、Yak-KC5、Yak-KC6、Yak-KC7 对大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)、金黄色葡萄球菌均有良好的抑制作用,Yak-KC7 对大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)、金黄色葡萄球菌的抑制作用最佳。动物性试验证明,牦牛源枯草芽孢杆菌对被大肠埃希氏菌(血清型 O₁₁₁)感染的家兔肠道有良好的治疗效果,且该菌安全无毒,不具有耐药性。综上,牦牛源枯草芽孢杆菌具有益生作用,有作为益生菌株的潜

能,为西藏地区益生菌种提供了参考。

参考文献:

- [1]郭梦娇. 枯草芽孢杆菌的筛选及其诱导免疫抗大肠杆菌感染先天性免疫应答机制研究[D]. 泰安:山东农业大学,2018.
- [2]窦茂鑫,赵迪,王蕾,等. 猪源枯草芽孢杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 养殖与饲料,2012(4):11-14.
- [3]王静,李晓颖,谷巍. 微生态制剂肽菌素 717 在蛋雏鸡上的应用[J]. 饲料与畜牧,2012(5):49-50.
- [4]熊媛媛. 猪源益生肠球菌的分离鉴定和筛选[D]. 武汉:华中农业大学,2010.
- [5]梁云飞. 益生菌及其在养殖业中的应用[J]. 中国畜牧兽医,2006(4):70-72.
- [6]王保华,孙冬岩,孙笑非. 益生芽孢杆菌对大肠杆菌攻毒断奶仔猪的保护作用[J]. 饲料研究,2012(12):36,39.
- [7]林东鑫. 待产孕妇鼻腔金黄色葡萄球菌定殖状况及其危险因素研究[D]. 广州:广东药科大学,2017.
- [8]战立聪,王菲,董海龙,等. 牦牛源乳酸杆菌对牦牛肠黏膜细胞黏附的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2018(9):6-9,241.
- [9]刘冬梅,李理,杨晓泉,等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品研究与开发,2006(3):110-111.
- [10]孙昊岩,蒋立文,李珊珊,等. 一株鸡源芽孢杆菌的分离鉴定和益生性研究[J]. 家禽科学,2018(1):6-10.
- [11]王建东,刘溪源,杨慧君,等. 利用 VITEK-2 高级专家系统鉴定奶牛隐性乳房炎致病菌及其耐药性分析[J]. 中兽医医药杂志,2015,34(1):9-12.
- [12]谢玉丹. YY1 调控结肠癌细胞糖代谢重编程的作用及其分子机制研究[D]. 重庆:重庆大学,2017.
- [13]梁晋琼. 采用枯草芽孢杆菌活菌制剂预防和治疗仔猪细菌性腹泻的研究[J]. 农业技术与装备,2011(11):64-65.
- [14]董常生. 家畜组织学与胚胎学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [15]张檬. 五得汤加减治疗大肠湿热型溃疡性结肠炎的临床研究[D]. 济南:山东中医药大学,2017.
- [16]秦瑶,王苇,郭秉娇,等. 2 株枯草芽孢杆菌对大肠杆菌和沙门氏菌的体外抑菌试验研究[J]. 中国畜牧兽医,2014,41(1):207-209.
- [17]马卫明. 猪小肠抗菌肽分离鉴定及其生物活性研究[D]. 北京:中国农业大学,2004.
- [18]王可洲. 兔小囊肽的分离鉴定及生物学活性研究[D]. 北京:中国农业大学,2003.
- [19]顾江. 肠出血性大肠杆菌 O₁₅₇:H₇ 重要致病因子的晶体结构、功能和应用研究[D]. 重庆:第三军医大学,2010.
- [20]杜丹,方立超,陈丙波,等. 嗜酸乳杆菌合生元对抗生素相关腹泻大鼠肠黏膜屏障的保护作用研究[J]. 放射免疫学杂志,2008,21(6):496-499.
- [21]王斌,李京京,李秋荣,等. 乳杆菌对致病性大肠杆菌感染小鼠肠黏膜屏障功能的影响[J]. 肠外与肠内营养,2007(6):321-325.
- [22]郭兴华. 益生菌——基础与应用[M]. 北京:北京科学技术出版社,2002.